

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Akira OKANO, et al.

GAU:

SERIAL NO: NEW APPLICATION

EXAMINER:

FILED: HEREWITH

FOR: INSULIN RECEPTOR-RELATED RECEPTOR BINDING PROTEIN AND UTILIZATION OF THE SAME

REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS

WASHINGTON, D.C. 20231

SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
Japan	2000-170912	June 7, 2000

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number .  
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and  
(B) Application Serial No.(s)
- ☐ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon

Registration No. 24,618

C. Irvin McClelland  
Registration Number 21,124



22850

Tel. (703) 413-3000  
Fax. (703) 413-2220  
(OSMMN 10/98)



B-743/AY-US

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

J1046 U.S. PTO  
09/874056  
06/06/01

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年 6月 7日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-170912

出 願 人

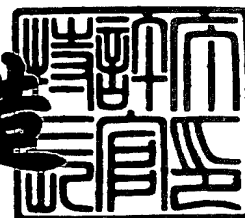
Applicant (s):

味の素株式会社

2001年 3月16日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3020716

【書類名】 特許願

【整理番号】 P-7478

【提出日】 平成12年 6月 7日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 38/00  
C12N 15/00

【発明の名称】 インスリン受容体関連受容体結合蛋白質及びその利用

【請求項の数】 14

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社医薬研究所内

【氏名】 岡野 明

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社医薬研究所内

【氏名】 江藤 譲

【発明者】

【住所又は居所】 群馬県前橋市平和町一丁目 1 0 番地 2 - 4 0 2

【氏名】 泉 哲郎

【特許出願人】

【識別番号】 000000066

【氏名又は名称】 味の素株式会社

【代理人】

【識別番号】 100089244

【弁理士】

【氏名又は名称】 遠山 勉

【選任した代理人】

【識別番号】 100090516

【弁理士】

【氏名又は名称】 松倉 秀実

【選任した代理人】

【識別番号】 100100549

【弁理士】

【氏名又は名称】 川口 嘉之

【連絡先】 03-3669-6571

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 012092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 インスリン受容体関連受容体結合蛋白質及びその利用

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の性質を有する蛋白質又はその改変体であって、インスリン受容体関連受容体に結合する活性を有する蛋白質。

(a) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列を含む。

(b) フーリエ変換イオンサイクロトロン法による質量分析によって測定される分子量：約 6 1 3 5、6 2 0 6、6 2 5 0 又は 6 3 2 1。

【請求項 2】 配列番号 3 ～ 7 のいずれかのアミノ酸配列を有する請求項 1 記載の蛋白質。

【請求項 3】 インスリン受容体関連受容体に結合する蛋白質又は同蛋白質のアゴニストもしくはアンタゴニストを有効成分として含む医薬組成物。

【請求項 4】 インスリン受容体関連受容体が発現している細胞の増殖分化を制御する作用を有する請求項 3 記載の医薬組成物。

【請求項 5】 前記細胞が糖尿病、神経障害、腎臓障害、胃腸障害に関与する細胞である請求項 4 記載の医薬組成物。

【請求項 6】 前記細胞が膵  $\beta$  細胞である請求項 5 記載の医薬組成物。

【請求項 7】 インスリン受容体関連受容体と結合する蛋白質が、エピテリン／グラニューリン類である請求項 3 ～ 6 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 8】 エピテリン／グラニューリン類が、ホルボールエステルで刺激したラットグリオーマ細胞培養上清に含まれ、C 1 8 逆相 H P L C カラムより 8 ～ 2 0 % アセトニトリルにて溶出される画分に濃縮される蛋白質であることを特徴とする請求項 7 記載の医薬組成物。

【請求項 9】 エピテリン／グラニューリン類が配列番号 8 のアミノ酸配列を含む請求項 7 記載の医薬組成物。

【請求項 1 0】 エピテリン／グラニューリン類が、配列番号 3 ～ 7 のいずれかのアミノ酸配列を有する蛋白質、又は、インスリン受容体関連受容体に結合する活性を有する改変体である請求項 7 記載の医薬組成物。

【請求項 1 1】 請求項 1 記載の蛋白質をコードする DNA。

【請求項 1 2】 配列番号 3 ～ 7 のいずれかのアミノ酸配列をコードする請求項 1 1 記載の DNA。

【請求項 1 3】 インスリン受容体関連受容体と同受容体に結合する蛋白質との結合を被検物質の存在下で行い、該結合の阻害を測定することを特徴とするインスリン受容体関連受容体結合蛋白質のアゴニスト又はアンタゴニストの探索方法。

【請求項 1 4】 前記インスリン受容体関連受容体と同受容体に結合する蛋白質との結合を、表面プラズモン共鳴のシフト変化により検出し、それによって該結合の阻害を測定することを特徴とする、請求項 1 3 記載のインスリン受容体関連受容体結合蛋白質のアゴニスト又はアンタゴニストの探索方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は細胞の増殖分化を制御する治療剤及び当該治療剤を探索する方法に関する。より詳細に言えば、糖尿病、神経障害、腎臓障害、胃腸障害等に関与する細胞の増殖分化を制御する治療剤及び当該治療剤を探索する方法に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

多くの増殖、分化因子受容体は複数のファミリーを構成しており、それぞれ類似した構造を持つ細胞内キナーゼドメインと、細胞外リガンド結合ドメインから構成されている。

【0 0 0 3】

近年、遺伝子情報から構造的に受容体をコードしていると思われる新規遺伝子が多数見つかってきており、これらはリガンドが不明なことからオーファン受容体と呼ばれているが、そのリガンドの中には重要な生体調節作用を制御する因子が存在していることが、ファミリー受容体の機能や発現部位の特異性から推測される。

【0 0 0 4】

インスリン受容体関連受容体 (insulin receptor-related receptor ; 以下「I

RR」と記載することがある)は、インスリン受容体ファミリーに属するオーファン受容体である(Shierら、J.Biol.Chem., 264: 14605, 1989)。インスリン、インスリン様増殖因子(IGF)-1といった既知のインスリンファミリーは、リガンドとして対応する受容体へ結合し、受容体の自己リン酸化を介し、受容体を発現している細胞の増殖やグルコーストランスポーターの発現、肝糖新生系の阻害といった機能を調節する。したがって、IRRに対するリガンドを用いれば、IRRとの結合、IRRリン酸化を介し、IRR発現細胞の増殖分化や機能を調節できることが期待される。しかしインスリン、IGF-1といった既知のインスリンファミリーは、IRRとの結合及びリン酸化シグナルの伝達を引き起こせないことが報告されており(Zhangら、J.Biol.Chem., 267: 18320, 1992)、IRRと特異的に結合するリガンドの本体は未だ不明であった。

#### 【0005】

肥満等、生活習慣の変化に起因したインスリン抵抗性の増大は、近年の2型糖尿病患者数増加の大きな原因である。しかしインスリン抵抗性に対し、膵臓中のランゲルハンス島に存在するインスリン分泌細胞である $\beta$ 細胞の代償的増殖、分化が起これば、糖尿病の発症に至らないこともまた報告されている(Terauchiら、J. Clin. Invest., 99: 861, 1997)。膵 $\beta$ 細胞の容量を調節している生理的機構は不明であるが、その調節因子の解明は、糖尿病患者の内因性あるいは移植膵 $\beta$ 細胞容量の増大、維持を図るという新しい観点に立った予防、治療法を提供するものである。

#### 【0006】

近年、インスリン受容体キナーゼの細胞内基質のひとつであるIRS-2をノックアウトしたマウスの所見から、IRS-2がインスリン需要量に対応する膵 $\beta$ 細胞の容量増大に必須であることが見出され、インスリン受容体ファミリーの関与が強く示唆され始めた(Withersら、Nature, 391: 900, 1998)。一方、IRRが膵 $\beta$ 細胞に高度に発現していること、さらに人工的に作製したインスリン受容体(IR)/IRRキメラ受容体を用い、IRRキナーゼがIRS-2をリン酸化することが確認され(Hirayamaら、Diabetes, 48: 1237, 1999)、IRRに結合する未知のリガンド(IRRリガンド)が膵 $\beta$ 細胞に作用し、同細胞の増殖、分化、生存維持を惹起する因

子であることが想定される。したがって、IRRリガンド及びそのアゴニストを得ることは、膵β細胞の増殖分化を調節する手段、方法を提供するものであり、またこれを生体に投与するならば膵β細胞の増殖分化を介して糖尿病の治療剤となることが期待される。

【0007】

また、IRRは神経、腎、胃などの限局された特定の組織、細胞に発現していることが報告されており（Reinhardtら、Endocrinology, 133: 3, 1993、Wattら、Adv.Exp.Med.Biol., 343: 125, 1993）、これらの細胞の増殖分化にも関与していると考えられる。したがって、IRRリガンド及びそのアゴニストを用い、これらの組織、細胞の増殖分化を惹起することにより、先天的あるいは薬物や自己免疫、炎症等による後天的な神経障害、腎臓障害、胃腸障害などの治療剤としても有用であることが期待される。

【0008】

さらにIRRリガンドのアンタゴニストは当該組織、細胞の過剰増殖、過剰機能亢進に起因または伴う疾患、例えば増殖性腎炎の治療剤となることが期待される。

しかし、前述したように、IRRリガンドは同定されておらず、またIRRリガンドが不明のため、そのアゴニスト、アンタゴニストを簡便に探索する方法もない。

【0009】

ところで、癌細胞の増殖を抑制する因子（Shoyabら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 7912, 1990）、あるいは白血球顆粒に存在するシステインリッチな蛋白質として（Batemanら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 173: 1161, 1990）、エピテリン／グラニューリン（Epithelin/granulin）類が知られている。エピテリン／グラニューリン類としては、グラニューリンA（エピテリン1）、B（エピテリン2）の他、C～Gまで計7種類が知られている。

【0010】

エピテリン／グラニューリン類に属するポリペプチドの機能、用途として、エピテリン1、2の腫瘍細胞成長阻害作用、上皮細胞増殖促進作用（創傷治癒促進）、ケラチノサイト増殖促進作用（拮抗剤による乾癬治療）が示されている（Shoy



abら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:7912, 1990、W091/15510A)。また、エピテリン／グラニューリン前駆体そのもの(PCDGF, GP88)が、腫瘍細胞や繊維芽細胞の増殖を促進するとの報告もある(Zhouら、J. Biol. Chem., 268: 10863, 1993、Xuら、J. Biol. Chem., 273: 20078, 1998、W0 98/52607)。さらに、エピテリン1がヒト乳癌細胞膜上の140-145kDaの蛋白質に結合すること(Culouscouら、J. Biol. Chem., 268: 10458, 1993)、及び、PCDGFがミンク肺上皮細胞株膜上の120 kDaの蛋白質と結合すること(Xiaら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 245: 539, 1998)が示唆されている。しかし、これらのエピテリン1及びPCDGFが結合する蛋白は特定されておらず、エピテリン／グラニューリン類の受容体は未だ不明であり、IRRとの関連を示唆する報告は全くない。

#### 【0 0 1 1】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記観点からなされたものであり、これまで未知のIRRリガンドを同定し、その用途、及びIRRリガンドのアゴニスト、アンタゴニストを検索する方法を提供することを主要な課題とする。

#### 【0 0 1 2】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者は、上記目的のため鋭意研究を重ねた結果、細胞培養上清から、IRRと特異的に結合する活性を有する蛋白質を精製し、この蛋白質を同定することに成功し、本発明を完成するに至った。

#### 【0 0 1 3】

具体的には、76種の細胞について、ホルボールエステルで刺激した培養上清を採取し、濃縮後、IRR特異的な結合を示すものを表面プラズモン共鳴 (SPR) 法でスクリーニングし、8種の細胞培養上清にIRR特異的な結合活性を認めた。この中で、ラットC6グリオーマ細胞(ATCC番号CCL-107)について大量培養を行い、培養上清を採取し粗分画した後、IRR特異的結合活性を指標に3段階の逆相HPLCにより精製を行った。そして、精製した蛋白質のN末端アミノ酸配列を決定し、質量分析により分子量を測定し、データベース情報より対応する蛋白質を同定した。その結果、精製された蛋白質は、配列番号3～7に示すアミノ酸配列で示さ

れる57～59アミノ酸からなる、分子量6135、6206、6250又は6321のエピテリン/  
グラニューリン類に属する蛋白質であった。

すなわち本発明は、以下のとおりである。

【0014】

(1) 以下の性質を有する蛋白質又はその改変体であって、インスリン受容体関連受容体に結合する活性を有する蛋白質。

(a) 配列番号1に示すアミノ酸配列を含む。

(b) フーリエ変換イオンサイクロトロン法による質量分析によって測定される分子量：約6135、6206、6250又は6321。

(2) 配列番号3～7のいずれかのアミノ酸配列を有する(1)の蛋白質。

【0015】

(3) インスリン受容体関連受容体に結合する蛋白質又は同蛋白質のアゴニストもしくはアンタゴニストを有効成分として含む医薬組成物。

(4) インスリン受容体関連受容体が発現している細胞の増殖分化を制御する作用を有する(3)の医薬組成物。

(5) 前記細胞が糖尿病、神経障害、腎臓障害、胃腸障害に関与する細胞である(4)の医薬組成物。

(6) 前記細胞が膵β細胞である(5)の医薬組成物。

(7) インスリン受容体関連受容体と結合する蛋白質が、エピテリン／グラニューリン類である(3)～(6)のいずれかの医薬組成物。

(8) エピテリン／グラニューリン類が、ホルボールエステルで刺激したラットグリオーマ細胞培養上清に含まれ、C18逆相HPLCカラムより8～20%アセトニトリルにて溶出される画分に濃縮される蛋白質であることを特徴とする(7)の医薬組成物。

(9) エピテリン／グラニューリン類が配列番号8のアミノ酸配列を含む(7)の医薬組成物。

(10) エピテリン／グラニューリン類が、配列番号3～7のいずれかのアミノ酸配列を有する蛋白質、又は、インスリン受容体関連受容体に結合する活性を有する改変体である(7)の医薬組成物。

【 0 0 1 6 】

( 1 1 ) ( 1 ) の蛋白質をコードする DNA。

( 1 2 ) 配列番号 3 ～ 7 のいずれかのアミノ酸配列をコードする ( 1 1 ) の DNA。

( 1 3 ) インスリン受容体関連受容体と同受容体に結合する蛋白質との結合を被検物質の存在下で行い、該結合の阻害を測定することを特徴とするインスリン受容体関連受容体結合蛋白質のアゴニスト又はアンタゴニストの探索方法。

( 1 4 ) 前記インスリン受容体関連受容体と同受容体に結合する蛋白質との結合を、表面プラズモン共鳴のシフト変化により検出し、それによって該結合の阻害を測定することを特徴とする、( 1 3 ) のインスリン受容体関連受容体結合蛋白質のアゴニスト又はアンタゴニストの探索方法。

【 0 0 1 7 】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の IRR リガンドは、IRR に特異的に結合する蛋白質である。

【 0 0 1 8 】

本発明の IRR リガンドは、例えば、後記実施例に示したように、ラット C6 グリオーマ細胞の培養上清から逆相 HPLC あるいはその他の手段を用いて精製してもよいし、ペプチド合成法で合成してもよい。またアミノ酸配列に対応する遺伝子を当該分野でよく知られている方法で取得し、これを用いて遺伝子組換え法により細菌、酵母、昆虫細胞、哺乳類細胞等で作製してもよい。ラット C6 グリオーマ細胞の培養上清から精製された IRR リガンドのアミノ酸配列決定及び質量分析により、配列番号 3 ～ 7 に示すアミノ酸配列が得られている。

【 0 0 1 9 】

本発明の IRR リガンドは、ラット由来のものでもよいし、IRR に結合するという性質を持つ限り、ヒト、サル、マウス、イヌ、ウシ、ウサギといった哺乳類や鳥類、魚類その他いかなる動物由来の IRR リガンドでもよい。IRR リガンドを医薬組成物の成分として用いる場合には、哺乳類由来のものが好ましい。

【 0 0 2 0 】

また、IRRリガンドは、実施例で同定されたIRRリガンド蛋白質に加えて、IRRに結合するという性質を持つ限り、配列番号 8、又は配列番号 3～7 に示すアミノ酸配列において 1 若しくは複数の位置での 1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加を有するものであってもよい。本発明において「改変体」とは、このようなアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加を有するもの、又は修飾を有するものをいう。

#### 【0021】

また、本発明のIRRリガンドは、IRRに結合するという性質を持つ限り、1 ないし複数個の同じまたは異なる蛋白質がタンデムに結合したものでもよい。またIRRに結合するという性質を持つ限り、糖鎖が結合したものでも、結合していないものでもよい。

#### 【0022】

後記実施例で精製されたIRRリガンドのN末端アミノ酸配列について、データベース検索を行ったところ、ラットエピテリン／グラニューリン前駆体として知られる遺伝子がコードするアミノ酸配列の440～460番目のアミノ酸配列と一致し、グラニューリンDドメイン (Bhandariら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:1715, 1992) に相当する蛋白質であることが推定された。さらに、IRRリガンドの再精製、及び、フーリエ変換イオンサイクロトロン法による質量分析結果 (6135、6250、6321又は6206) から、ラットC6細胞培養上清より得られるIRRリガンドは、エピテリン／グラニューリン前駆体の439番目のアスパラギン酸又は440番目のイソロイシンをN末端とし、495番目のリジン、496番目のアスパラギン酸又は497番目のアラニンでC末端とする、439～497番目までの57～59アミノ酸から成り、6個の分子内Cys-Cys結合を持つ蛋白質であることが明らかとなった。

#### 【0023】

ここでエピテリン／グラニューリン類について簡単に説明すると、エピテリンは癌細胞の増殖を抑制する因子としてラット腎臓より精製された蛋白質であり (Shoyabら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 7912, 1990)、グラニューリンはヒト白血球顆粒に存在するシステインリッチな蛋白質として精製された蛋白質である (Batemanら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 173: 1161, 1990)。エピテリ

ン／グラニューリンcDNAクローニングにより、当該cDNAはエピテリン／グラニューリン群の共通の前駆体をコードし、グラニューリンA（エピテリン1）、B（エピテリン2）のほかC～Gまで、計7つのシステインに富んだモチーフがタンデムに含まれることが判明している。また、ラットエピテリン前駆体のアミノ酸番号440～495まで（Plowmanら、J. Biol. Chem., 267: 13073, 1992、W091/15510A）、または438～492まで（グラニューリンD；Bhandariら、Endocrinology, 133: 2682, 1993）の領域も、モチーフの1つであることが開示されている。また、上記文献（W091/15510A）には、エピテリン／グラニューリン類の共通構造として、 $CX_5-6CX_5CCX_8CCX_6CCXDXXHCCPX_4CX_5-6C$ （配列番号8）、及びこの配列の前後に任意の2アミノ酸付加された配列からなる構造が開示されている。実施例で精製されたIRRリガンドは、この配列番号8で示される共通構造を保持している。

#### 【0024】

以上のことから、他のグラニューリン／エピテリン類又はそれらの変異体、具体的には例えば、 $CX_5-6CX_5CCX_8CCX_6CCXDXXHCCPX_4CX_5-6C$ で表されるエピテリン／グラニューリン類の蛋白質であれば、IRRに結合すると想定される。

#### 【0025】

本発明においてIRRリガンドとは、配列番号8、又は配列番号3～7に示すアミノ酸配列を有するものに限られず、上記のようにIRRに結合する蛋白質も含めてIRRリガンドと総称する。本発明のDNAは、このようなIRRリガンドをコードするDNAである。

#### 【0026】

尚、報告、開示されたグラニューリンDはホモ2量体またはヘテロ2量体と推定されている（Batemanら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 173: 1161, 1990、W093/15195）が、本発明で精製されたIRRリガンドは質量分析の結果から分子間結合のない単量体である。

#### 【0027】

ラットC6グリオーマ細胞をはじめとするIRRリガンドを発現する細胞上清からIRRリガンドを精製する際の活性画分の決定、あるいは、グラニューリン／エピテリン類又はそれらの変異体がIRRリガンドであることの同定は、試料のIRRに対する

結合活性を測定することによって行うことができる。IRRに対する被験検体の結合活性は、表面プラズモン共鳴（SPR）測定装置、例えばBIACORE（ピアコア社）を用い、測定することができる。具体的には例えば、IRRの細胞外ドメインを可溶性蛋白質として作製し、これをBIACOREセンサーチップの表面に固定化し、被験検体はマイクロ流路系を介して一定の流速でセンサーチップ表面上に送液する。被験検体中にIRRに結合する分子（IRRリガンド）が含まれていた場合、IRR-IRRリガンド分子間の結合によりセンサーチップ表面の質量が増加し、結合量に比例したSPRシグナルのシフトを共鳴単位（RU）の変化として検出できる。IRR特異的結合であることは、IRR以外の蛋白を固定化したセンサーチップを同時に作製し、このチップに被験検体を流したときの共鳴単位の変化を差し引くことで、溶媒等によるいわゆるバルク効果を除くことにより、確認できる。尚、IRR以外の蛋白として、例えばインスリン受容体（IR）蛋白質を用いると、IRR結合活性をより正確に測定することができる。

## 【 0 0 2 8 】

探索に用いる可溶性IRR蛋白は、IRR cDNAを用いて、通常の遺伝子組換え法による蛋白質生産と同様にして作製することができる。例えば、マウスIRR cDNAは、例えばHirayamaら、Diabetes, 48: 1237, 1999に示されている方法で、PCRにより増幅したマウスIRRのキナーゼ領域のcDNA断片をプローブとして、膵β細胞株bHC9あるいはMIN6 cDNAライブラリーよりクローニングすることにより取得することができる。対照として可溶性IR蛋白質を用いる場合、IR cDNAは、例えばWhittakerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 5237, 1987に示されている方法により、合成オリゴヌクレオチドをプローブとして、ヒト腎cDNAライブラリーより取得することができる。

## 【 0 0 2 9 】

IRR又はIRを可溶性蛋白として得る場合には、上記IRR cDNA又はIR cDNAより細胞外領域をコードする断片を取得し、必要に応じ適当な合成オリゴヌクレオチドをアダプター、スペーサーとして、発現ベクターに導入し、適当な宿主にトランスフェクションし、適当な時間培養後細胞破碎液または培養上清より目的蛋白を精製すればよい。また、IRR又はIRと、IgGのH鎖定常領域（Fc領域）、アルカリ

ホスファターゼ、FLAGなどとの融合蛋白を作製させることは、目的とする蛋白質の精製を簡便にするのでより好ましい。IgG cDNAとしては、例えばNishimuraら、Cancer Res., 47: 999, 1987に示すように、ヒトブラズマ白血病細胞株ARH77よりヒトIgG1鎖を得ることができる。例えば、IRR-Fc、IR-Fc融合蛋白を作製する場合は、マウスIRRの細胞外領域(1-920残基)またはヒトIRの細胞外領域(1-944残基)を含むDNA断片とヒトIgG1のH鎖C(定常)領域(Fc領域)を含むDNA断片を発現ベクターpEF-BOS(Mizushimaら、Nucleic Acid Res. 18: 5322, 1990)に組みこみ、プラスミドを構築する。これを定法に従いCHO細胞へトランスフェクションし、G418を含む培地で培養し、耐性クローンを選択する。そしてこの培養上清をプロテインAカラムに添加し、吸着画分を回収すれば目的のIRR-Fc融合蛋白、IR-Fc融合蛋白を取得することができる。

## 【 0 0 3 0 】

本発明のIRRリガンドは、膵 $\beta$ 細胞等、細胞上にIRRが発現している細胞のIRRに特異的に結合し、それらの細胞の増殖分化を制御する活性を有する。したがって、IRRリガンド、又はそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、糖尿病、神経障害、腎臓障害、胃腸障害に関与する細胞の増殖分化を抑制又は亢進することによって、これらの疾患の治療剤として用いることができると考えられる。

## 【 0 0 3 1 】

先にも述べたように、2型糖尿病の発症にはインスリン分泌不全とインスリン抵抗性の両者が必要とされ、インスリン抵抗性であっても $\beta$ 細胞の代償的増殖が起きているマウスでは糖尿病の発症には至らないことが示唆されている。またインスリン抵抗性を来す肥満であっても糖尿病を発症していない人は、糖尿病患者に比べ膵臓の $\beta$ 細胞数が多いとの報告もある。逆にいえば、糖尿病患者では $\beta$ 細胞の代償的増殖が不十分なことが想定される。したがって、 $\beta$ 細胞の代償的増殖メカニズムを人為的に亢進して、 $\beta$ 細胞の増殖再生促進及び/または生存維持を誘導することができれば、2型糖尿病の治療、発症予防、特にインスリン補充療法で血糖管理を行っているような重症2型糖尿病に対しては、根本的治療となることが期待される。

## 【 0 0 3 2 】

また、IRRリガンドとIRRの結合を阻害するアゴニスト、アンタゴニストは、IRRリガンドを用いることにより探索することができる。すなわち、IRRリガンドとIRRに結合する蛋白質との結合を被検物質の存在下で行い、該結合の阻害を測定することにより、IRRリガンドのアゴニスト又はアンタゴニストを探索することができる。アゴニスト、アンタゴニストの具体的な探索法として一例を提示すれば、IRRを発現している細胞にIRRリガンドを添加して起こる生物学的反応が、被検物質の存在の有無で差があるかを見る方法、あるいは、放射性物質や蛍光物質等で標識したIRRリガンドと、IRRを発現している細胞又は同細胞から調製したIRRとの結合に対する阻害を、被検物質の存在下又は非存在下で測定する方法等が挙げられる。また、IRRを発現している細胞の細胞膜より調製したIRRにIRRリガンドを添加して起こるリン酸化等の生化学反応に対する修飾を指標とすることもできる。

#### 【0033】

さらに、後記実施例で実施したように、遺伝子組換え法等で作製したIRRの細胞外部分蛋白質（可溶性IRR）を適当な固相に固定し、これに対するIRRリガンドの結合の阻害を指標とすることもできる。具体的には例えば、表面プラズモン共鳴（SPR）測定装置を用い、可溶性IRRを結合したセンサーチップと、何も結合しない、またはイムノグロブリンや可溶性IRを結合したセンサーチップを準備する。そしてIRRリガンド溶液と事前、同時、または事後に、被検物質の溶液を流し、IRRリガンドによるIRR結合センサーチップ特異的なSPRシフトの変化を抑制する物質を探索することにより、低分子のアゴニスト、アンタゴニストを感度良く見出すことができる。以上のように、IRRリガンドがIRR特異的に惹起する反応を修飾、阻害することを検出する方法であれば、どのような方法でもよい。

#### 【0034】

探索手段として用いられるIRRリガンドは、IRRに結合するエピテリン／グラニユリン類の蛋白質であれば、本発明実施例記載の蛋白質には限定されない。

本発明において、IRRリガンドをそのアゴニスト、アンタゴニストの探索手段として用いる場合は、評価方法により異なるが、一般的に溶媒等に特に制限はなく、濃度は通常1pg/ml～1g/ml、より好ましくは1ng/ml～1mg/ml、さらにより好



ましくは10ng/ml～10 $\mu$ g/mlの濃度範囲で用いる。

【0035】

本発明においてIRRリガンドまたはそのアゴニストもしくはアンタゴニストを治療剤として使用する場合は、注射剤（静脈内、皮下、筋肉内等）もしくは経口剤として投与される。投与量は症状により異なるが、通常成人1日あたり1pg～1gの用量範囲である。

【0036】

IRRリガンドまたはそのアゴニストもしくはアンタゴニストの製剤化は、通常の方法で注射剤、吸入剤、錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤、坐剤等の剤型とする。例えば注射剤を調整する場合には、主薬に必要によりpH調整剤、緩衝剤、安定化剤、保存剤などを添加する。

【0037】

【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

【0038】

【実施例1】ラットC6細胞培養上清からのIRRリガンドの精製

<1>細胞培養上清の採取

ラットC6細胞（ATCC番号CCL-107）を、初発密度 $3 \times 10^4$ 細胞/mlで400mlの10% FCS（ウシ胎仔血清）を含有する $\alpha$ -MEM核酸含有培地に懸濁し、ローラーボトル（ファルコン3007）中、37℃、0.5回転/分の速度で密閉回転培養した。3日間培養後、培地を除去し、400mlの $\alpha$ -MEM核酸含有培地と100ng/mlのTPA（phorbol 12-myristate 13-acetate）を加え、更に72時間培養し、培養上清を採取した。

【0039】

<2>IRRリガンドの精製

培養上清1.95Lに1.95mlのTFA（トリフルオロ酢酸）を加え、逆相カラム（5cm 直径 $\times$ 7.6cm長；150ml/YMC C4 300A S-40（YMC社））に添加した。300mlの0.1% TFAで洗浄後、20%アセトニトリル-0.1% TFA 300mlで溶出した。

【0040】

20%溶出画分のIRR結合活性を、後述の測定法によって確認した後、2倍量の0.

1% TFAで希釈後、HPLCカラム（10mm直径×250mm長；Cosmosil 5TMS-300（ナカライテスク社））に吸着させ、8%アセトニトリルを含有する0.1% TFAで充分洗浄後、アセトニトリル濃度勾配（1.6%/分）で溶出した。流量は3ml/分とし、3mlずつ分画した。HPLCクロマトグラムを図1に示す。IRR結合活性は、主として黒太線で示した画分に回収された（図1）。

【0041】

上記活性画分を2倍量の0.1% TFAで希釈後、HPLCカラム（4.6mm直径×250mm長；Cosmosil 5TMS-300）に吸着させ、8%アセトニトリルを含有する0.1% TFAで充分洗浄後、アセトニトリル濃度勾配（0.8%/分）で溶出した。流量は1ml/分とし、肉眼的に280nmのピークを分画した。このHPLCクロマトグラムを図2に示す。IRR結合活性は、主として黒太線で示した画分に回収された（図2）。

【0042】

上記活性画分を2倍量の0.1% TFAで希釈後、HPLCカラム（4.6mm直径×250mm長；Vydac 218TP54（バイダック社））に吸着させ、8%アセトニトリルを含有する0.1% TFAで充分洗浄後、アセトニトリル濃度勾配（1.6%/分）で溶出した。流量は1ml/分とし、肉眼的に280nmのピークを分画した。このHPLCクロマトグラムを図3に示す。IRR結合活性は主として黒太線で示した画分に回収された（図3）。

【0043】

<3>IRR結合活性の測定

上記の各精製ステップにおいて、IRR結合活性は以下のようにして測定した。

【0044】

（1）測定検体

被験検体溶液にウシ血清アルブミン（BSA）40 $\mu$ gをキャリアとして添加し、凍結後、スピードバックAS290A（サーバント社）を用いて溶媒を除去した。残査を200 $\mu$ lの1mM塩酸に溶解し、200 $\mu$ lの2×HBS（40mM HEPES、0.6% NaCl、12mM EDTA（pH7.5））で中和し、測定検体とした。

【0045】

精製プロセスにおける最終の2ステップでは、溶解液量、中和液量をそれぞれ

100  $\mu$ lとし、BSA添加量は20  $\mu$ gとした。

#### 【0046】

#### (2) 可溶性IRR及び可溶性IRの作製

マウスIRR cDNAは、PCRにより増幅したマウスIRRのキナーゼ領域のcDNA断片をプローブとして、脾 $\beta$ 細胞株bHC9/MIN6 cDNAライブラリー(Hirayamaら、Diabetes, 48, 1237-1244, 1999)よりクローニングした。

#### 【0047】

次に、pFas-FcIIベクター (Sudaら、J. Exp. Med., 179, 873-879, 1994、金沢大学がん研究所須田貴司博士より提供) のFas部分を、マウスIRRの細胞外領域(1-920残基)に入れ換えることにより、IRRとヒトIgG1のH鎖C(定常)領域(Fc領域)と融合した蛋白を発現するIRR-Fc融合蛋白発現プラスミドを構築した。対照として、ヒトIR cDNA (Kaburagiら、J. Biol. Chem., 268, 16610-16622, 1993、東京大学医学部鍋木康志博士より提供) を用い、pFas-FcIIベクターのFas部分をヒトIRの細胞外領域(1-944残基)に入れ換えることにより、同様にIR-Fc融合蛋白発現プラスミドを作製した。これらのプラスミドを定法に従いCHO細胞へトランスフェクションし、G418を含む培地で培養し、耐性クローンを選択した。上清への目的の融合蛋白を分泌するクローンを、抗ヒトIgG抗体を用いたウエスタンブロッティングで選択した。

#### 【0048】

これらの組換えCHO細胞を10cm培養用ディッシュ (Falcon 3003A) でコンフルエント ( $1 \sim 2 \times 10^7$  / ディッシュ) まで培養後、HamF-12培地 (血清、G418不含) 20 mlに培地交換し、48~72時間後に上清を無菌的に採取した。さらに、新たなHamF-12培地を添加し、同様の培養を繰り返し (最大3サイクル)、上清を採取した。培養上清をミニタンシステム (ミリポア社) を用い、再生セルロース膜 (PLGC0MP04) にて30~100倍に膜濃縮後、プロテインAカラム (アマシャムファルマシア社、HiTrap ProteinA, 1ml) を用い、定法に従い、IRR-Fc及びIR-Fc融合蛋白を精製した。

#### 【0049】

#### (3) 表面プラズモン共鳴 (SPR) 測定法によるIRR結合活性の評価

SPR測定は、BIAcore2000（ピアコア社）を用いて行った。

CM5センサーチップの各フローセルを、定法に従いEDC/NHS（N'-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミドヒドロクロリドとN-ヒドロキシコハク酸イミドの混合液）で活性化し（流速5  $\mu$ l/分、7分）、IRR-Fc（20  $\mu$ g/ml、10mM酢酸緩衝液（pH3.9））、IR-Fc（20  $\mu$ g/ml、10mM蟻酸緩衝液（pH3.7））を、それぞれ別のフローセルにアミンカップリング法で結合させた。

【0050】

流速を10  $\mu$ l/分に設定し、測定試料30  $\mu$ lを注入し、試料注入20秒前（baseline）及び注入開始165秒後（終了15秒前：bound1）のSPR（resonance units:RU）を測定した。チップは、10mM Glycine-HCl（pH2.35）10  $\mu$ lで洗浄、再生し、基線が安定した後、次の試料を測定した。

【0051】

各試料毎に、IRR-Fc固定化フローセルの結合値 [bound1-baseline]、及びIR-Fc固定化フローセルの結合値 [bound1-baseline] を求め、さらにIRR-Fc結合値からIR-Fc結合値を引いた差を、試料の結合値とした。

【0052】

結合値は文中、及び図1～3中に、○印及び数字で示した。

【0053】

【実施例2】 IRRリガンドのN末端アミノ酸配列の決定

実施例1で精製したIRR結合活性画分試料のN末端アミノ酸配列を、プロテインシーケンサー476A（アプライドバイオシステムズ）を用いて、取り扱いマニュアルの方法にしたがって、ポリブレン処理を行なったグラスフィルターを用いる方法により行なった。まず、マニュアルの方法にしたがってポリブレン処理したグラスフィルターに、図3の活性画分試料45  $\mu$ lを添加し、アミノ酸配列分析を行なった。

【0054】

22残基目までの試料由来のアミノ酸に相当すると考えられるPTHアミノ酸、及びPTHアミノ酸標品に対するピーク高から換算した検出量を表1に示す。

【0055】

【表 1】

表 1

残基番号	アミノ酸 (検出量pmol)	
1	Ile (15.9)	Asp (12.1)
2	Gly (12.5)	Ile (19.0)
3		Gly (16.6)
4	Asp (7.8)	
5	Gln (10.9)	Asp (11.9)
6	His (5.9)	Gln (15.1)
7	Thr (4.9)	His (7.8)
8		Thr (5.6)
9		
10	Pro (6.0)	
11	Val (6.1)	Pro (9.3)
12	Gly (3.3)	Val (8.9)
13	Gln (5.6)	Gly (9.0)
14	Thr (2.8)	Gln (8.7)
15		Thr (3.1)
16		
17	Pro (3.5)	
18		Pro (6.0)
19	Leu (3.1)	
20	Lys (2.9)	Leu (5.1)
21	Gly (3.4)	Lys (4.4)
22		Gly (4.6)

## 【0056】

上記の結果から、前記活性画分試料は、N末端アミノ酸配列は、配列番号1のアミノ酸配列をN末端に有するペプチドと、配列番号2のアミノ酸配列をN末端に有するペプチドの混合物であると考えられた。尚、各々の配列中のXaaは、本条件では検出されないシステイン残基、あるいは回収率が低いセリンあるいはスレオニン残基であると考えられた。

## 【0057】

アミノ酸シーケンスホモロジー (GENETYX) を用い、上記アミノ酸配列と相同性のある蛋白質をデータベース (NBRF) から検索した結果、50%以上の相同性

ある蛋白質として下記の蛋白質がヒットした。

【 0 0 5 8 】

エピテリン／グラニューリン前駆体－マウス

エピテリン／グラニューリン前駆体－ラット

アクログラニン (Acrogranin) －マウス

グラニューリン－ラット

グラニューリン前駆体－ヒト

IRRリガンドの精製に用いた細胞 (C6細胞) がラット由来であることから、ラットエピテリン／グラニューリン前駆体 (589アミノ酸) と、配列番号 1、2 のアミノ酸配列を比較したところ、配列番号 1 の配列はラットエピテリン／グラニューリン前駆体の 440～460 番目、配列番号 2 の配列は 439～460 番目のアミノ酸配列と一致した。

【 0 0 5 9 】

【実施例 3】 IRRリガンドの再精製

実施例 1 と同様にして培養したラット C6 細胞の培養上清 4L より、新たに IRR リガンドの精製を行った。培養上清から、YMC C4 300A S-40、Cosmosil 5TMS-300、Vydac 218TP54 を用いて実施例 1 と同様にして段階的に分画した活性粗画分の半量 (400  $\mu$ l) を 1.2ml の 0.05% HFBA (ヘプタフルオロ酪酸) で希釈した後、HPLC カラム (4.6mm 直径  $\times$  250mm 長; Vydac 218TP54) に吸着させ、8% アセトニトリルを含有する 0.05% HFBA で充分洗浄後、アセトニトリル濃度勾配 (1%/分で 30 分、以降 0.5%/分) で溶出した。流量は 1ml/分とし、肉眼的に 280nm のピークを分画した。このときのクロマトグラムを図 4 に示す。結合活性は矢印で示した画分 (ピーク 1 とピーク 2) に回収された (図 4)。さらに、ピーク 1 とピーク 2 を各々同一条件で再精製し、スピードバックにて 150-200  $\mu$ l に濃縮した。再精製標品 (約 10  $\mu$ g) の各々約 1/10 量を凍結乾燥後、200  $\mu$ l の緩衝液に溶解し結合活性を測定したところ、ピーク 1 は 13RU、ピーク 2 は 21RU の結合活性を示した。

【 0 0 6 0 】

第 4 図精製画分のピーク 1、及びピーク 2 の各 30  $\mu$ l を用いて、アミノ酸配列分析を行なった。22 残基目まで解析した結果、ピーク 1 からは配列番号 2 のアミ

ノ酸配列が、ピーク 2 からは配列番号 1 のアミノ酸配列と一致するアミノ酸配列が得られた。

#### 【0061】

##### 【実施例 4】質量分析による IRR リガンドの分子量の決定

図 3 の活性画分の試料  $10 \mu\text{l}$  に、メタノール  $10 \mu\text{l}$  と酢酸  $4 \mu\text{l}$  を添加した後、フーリエ変換イオンサイクロトロン質量分析計 APEXII70e (ブルカー・ダルトニクス社) を用い、GADT-マイクロエレクトロスプレーイオン法で、スペクトルを測定した。質量校正にはウシインスリン、ウシユビキチン、ニワトリリゾチームを用いた。

#### 【0062】

その結果、 $m/z=2045.6716$ ,  $1534.7963$ ,  $1228.0888$ ,  $1023.3715$  の主ピークが見出され、それぞれが  $[M+3H]^+3$ ,  $[M+4H]^+4$ ,  $[M+5H]^+5$ ,  $[M+6H]^+6$  に対応することから、分子量は 6135 と推定された。実施例 2 の結果と合わせ、第 3 図の活性画分の主成分は、ラット上皮テリン/グラニューリン前駆体の 439 番目のアスパラギン酸を N 末端とし、495 番目のリジンを C 末端とする、配列番号 3 のアミノ酸配列を有する蛋白質、または 440 番目のイソロイシンを N 末端とし、496 番目のアスパラギン酸を C 末端とする、配列番号 4 のアミノ酸配列を有する蛋白質であると考えられた。

#### 【0063】

DIGCDQHTSCPVGQTCCPSLKGSWACCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARTCEK (配列番号 3)

IGCDQHTSCPVGQTCCPSLKGSWACCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARTCEKD (配列番号 4)

#### 【0064】

また、 $[M+4H]^+4$  に対応する  $m/z=1563.5479$ ,  $1581.2989$ ,  $1552.5515$  の副ピークが見出されたことから、それぞれに相当する蛋白質の分子量は 6250, 6321, 6206 と推定された。実施例 2 の結果と合わせ、第 3 図の活性画分には、副成分として、ラット上皮テリン/グラニューリン前駆体の 439 番目または 440 番目のアミノ酸を N 末端とする、配列番号 5、6 又は 7 のアミノ酸配列を有する蛋白質が含まれていると考えられた。

#### 【0065】

DIGCDQHTSCPVGQTCCPSLKGSWACCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARTCEKD(配列番号 5)

DIGCDQHTSCPVGQTCCPSLKGSWACCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARTCEKDA(配列番号 6)

IGCDQHTSCPVGQTCCPSLKGSWACCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARTCEKDA(配列番号 7)

【 0 0 6 6 】

尚、上記の各蛋白質に含まれる12個のシステイン残基は、分子内で架橋していると推定される。

【 0 0 6 7 】

さらに、第4図精製画分のピーク1、ピーク2各10 $\mu$ lを用いて、同様に分子量を測定した。その結果、ピーク1は分子量6250と6321の蛋白を主ピークとし、配列番号5及び6のアミノ酸配列を有する蛋白質と推定された。

また、ピーク2は分子量6135の蛋白を主ピークとし、配列番号4のアミノ酸配列を有する蛋白質と推定された。

【 0 0 6 8 】

【発明の効果】

本発明によれば、膵 $\beta$ 細胞、及び神経、腎臓、胃腸細胞の増殖分化を制御するIRRリガンドとしてエピテリン／グラニューリン類の蛋白質を提供することができる。

【 0 0 6 9 】

またIRRリガンドのアゴニスト、アンタゴニストを探索する方法を提供することができる。

【 0 0 7 0 】

【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

<110> 味の素株式会社 (Ajinomoto Co., Inc.)

<120> インスリン受容体関連受容体結合蛋白質及びその利用

<130> P-7478



<140>

<141> 2000-06-07

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.0

【 0 0 7 1 】

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> UNSURE

<222> (3,8,9,15,16,18)

<223> Xaa=Cys or Ser or Thr

<400> 1

Ile Gly Xaa Asp Gln His Thr Xaa Xaa Pro Val Gly Gln Thr Xaa Xaa

1                      5                      10                      15

Pro Xaa Leu Lys Gly

20

【 0 0 7 2 】

<210> 2

<211> 22

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> UNSURE

<222> (4,9,10,16,17,19)

<223> Xaa=Cys or Ser or Thr

<400> 2

Asp Ile Gly Xaa Asp Gln His Thr Xaa Xaa Pro Val Gly Gln Thr Xaa

1

5

10

15

Xaa Pro Xaa Leu Lys Gly

20

【 0 0 7 3 】

<210> 3

<211> 57

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Asp Ile Gly Cys Asp Gln His Thr Ser Cys Pro Val Gly Gln Thr Cys

1

5

10

15

Cys Pro Ser Leu Lys Gly Ser Trp Ala Cys Cys Gln Leu Pro His Ala

20

25

30

Val Cys Cys Glu Asp Arg Gln His Cys Cys Pro Ala Gly Tyr Thr Cys

35

40

45

Asn Val Lys Ala Arg Thr Cys Glu Lys

50

55

【 0 0 7 4 】

<210> 4

<211> 57

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Ile Gly Cys Asp Gln His Thr Ser Cys Pro Val Gly Gln Thr Cys Cys

1 5 10 15

Pro Ser Leu Lys Gly Ser Trp Ala Cys Cys Gln Leu Pro His Ala Val

20 25 30

Cys Cys Glu Asp Arg Gln His Cys Cys Pro Ala Gly Tyr Thr Cys Asn

35 40 45

Val Lys Ala Arg Thr Cys Glu Lys Asp

50 55

【 0 0 7 5 】

<210> 5

<211> 58

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Asp Ile Gly Cys Asp Gln His Thr Ser Cys Pro Val Gly Gln Thr Cys

1 5 10 15

Cys Pro Ser Leu Lys Gly Ser Trp Ala Cys Cys Gln Leu Pro His Ala

20 25 30

Val Cys Cys Glu Asp Arg Gln His Cys Cys Pro Ala Gly Tyr Thr Cys

35 40 45

Asn Val Lys Ala Arg Thr Cys Glu Lys Asp

50 55

【 0 0 7 6 】

<210> 6

<211> 59

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Asp Ile Gly Cys Asp Gln His Thr Ser Cys Pro Val Gly Gln Thr Cys  
 1 5 10 15  
 Cys Pro Ser Leu Lys Gly Ser Trp Ala Cys Cys Gln Leu Pro His Ala  
 20 25 30  
 Val Cys Cys Glu Asp Arg Gln His Cys Cys Pro Ala Gly Tyr Thr Cys  
 35 40 45  
 Asn Val Lys Ala Arg Thr Cys Glu Lys Asp Ala  
 50 55

【0077】

<210> 7

<211> 58

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

Ile Gly Cys Asp Gln His Thr Ser Cys Pro Val Gly Gln Thr Cys Cys  
 1 5 10 15  
 Pro Ser Leu Lys Gly Ser Trp Ala Cys Cys Gln Leu Pro His Ala Val  
 20 25 30  
 Cys Cys Glu Asp Arg Gln His Cys Cys Pro Ala Gly Tyr Thr Cys Asn  
 35 40 45  
 Val Lys Ala Arg Thr Cys Glu Lys Asp Ala  
 50 55

【0078】

<210> 8

<211> 53

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> UNSURE

<222> (2,3,4,5,6,7,9,10,11,12,13,16,17,18,19,20,21,22,23,  
26,27,28,29,30,31,34,36,37,42,43,44,45,47,48,49,50,51,52)

<223> Xaa=optional amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (7,52)

<223> Xaa=may be nonexsistent

<400> 8

Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Cys	Cys	Xaa
1				5					10					15	
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Cys	Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Cys
				20					25					30	
Cys	Xaa	Asp	Xaa	Xaa	His	Cys	Cys	Pro	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Cys	Xaa	Xaa
		35						40						45	
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Cys											
				50											

【図面の簡単な説明】

【図 1】 実施例 1 において 20%アセトニトリル溶出画分の HPLC カラム (10m  
m 直径×250mm 長 ; Cosmosil 5TMS-300) 溶出結果と各画分の IRR 結合値を示した図  
である。

【図 2】 実施例 1 において第 1 図の画分 10、11 をプールしての、HPLC カラ

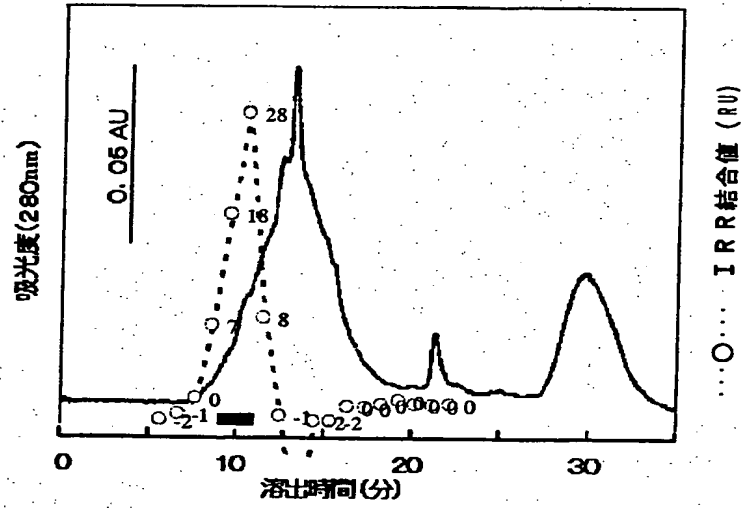
ム (4.6mm直径×250mm長 ; Cosmosil 5TMS-300) 溶出結果と各画分のIRR結合値を示した図である。

【図 3】 実施例 1 において第 2 図の画分 1 の HPLC カラム (4.6mm 直径×250mm 長 ; Vydac 218TP54) 溶出結果と各画分の IRR 結合値を示した図である。

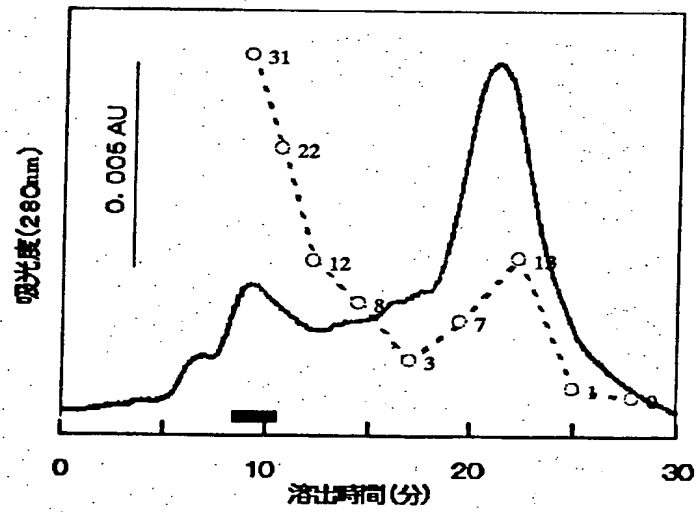
【図 4】 実施例 3 において、活性画分の最終精製における HPLC カラム (4.6mm 直径×250mm 長 ; Vydac 218TP54) 溶出結果を示した図である。

【書類名】 図面

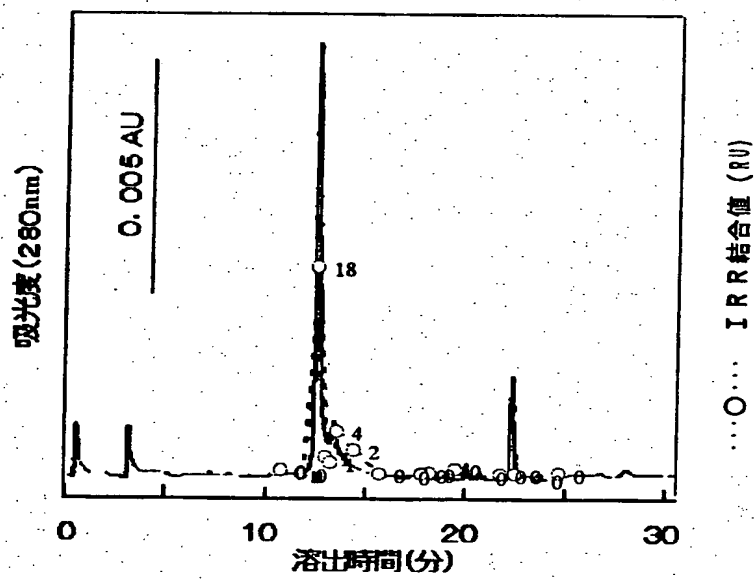
【図1】



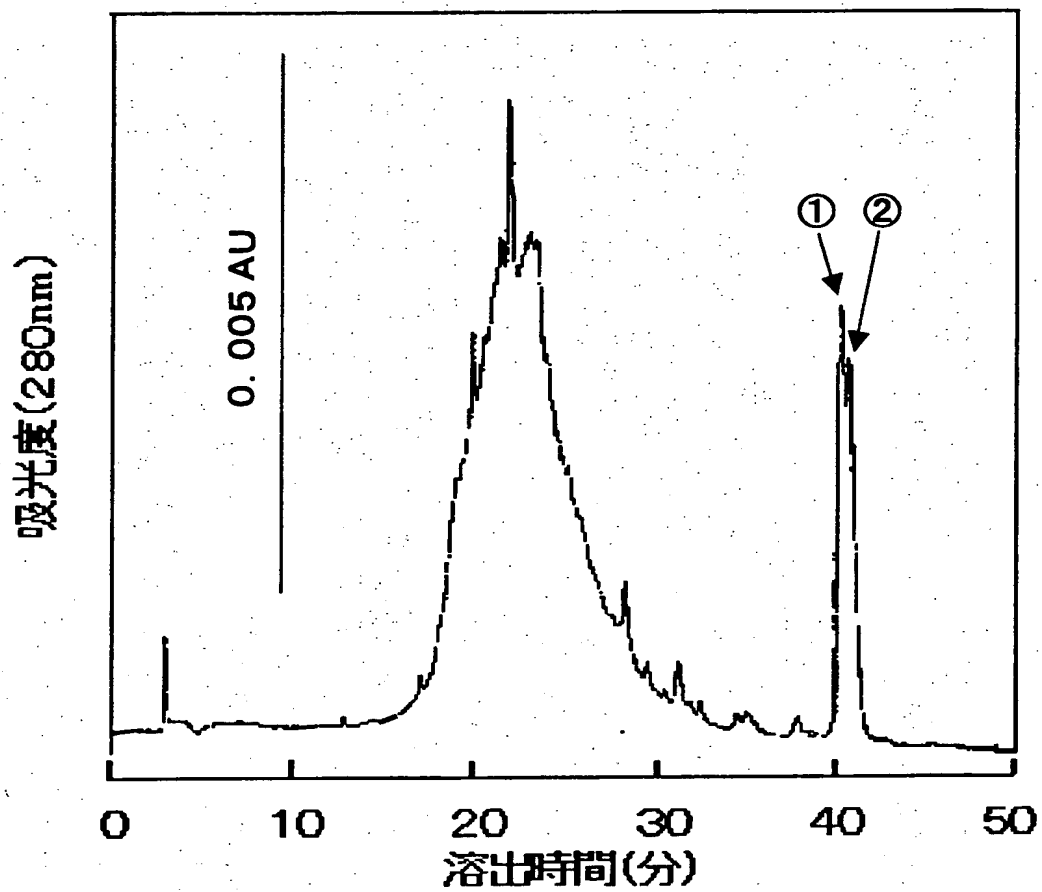
【図2】



【図 3】



【図 4】





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 インスリン受容体関連受容体（IRR）に結合するリガンドを同定し、その用途、及びIRRリガンドのアゴニスト、アンタゴニストを検索する方法を提供する。

【解決手段】 以下の性質を有する蛋白質又はその改変体であって、IRRに結合する活性を有する蛋白質と、インスリン受容体関連受容体との結合を被検物質の存在下で行い、該結合の阻害を測定することにより、IRRリガンドのアゴニスト又はアンタゴニストを探索する。

（a）配列番号1に示すアミノ酸配列を含む。

（b）フーリエ変換イオンサイクロトロン法による質量分析によって測定される分子量：約6135、6206、6250又は6321。

【選択図】 図1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000000066]

1. 変更年月日 1991年 7月 2日  
[変更理由] 住所変更  
住 所 東京都中央区京橋1丁目15番1号  
氏 名 味の素株式会社